



INSTITUT PASTEUR

CENTRE NATIONAL DE RÉFÉRENCE DES BACTÉRIES ANAÉROBIES ET DU BOTULISME

Unité des Bactéries Anaérobies et Toxines



RAPPORT ANNUEL D'ACTIVITÉ

Responsable : Michel-R. POPOFF

Responsable adjoint : Jean-Philippe CARLIER

Collaborateurs : Philippe BOUVET, Chargé de Recherche

Marie BEDORA, Technicienne

Guyène K'OUAS, Technicienne

Maria MANICH, Technicienne

Nathalie HATCHI, Secrétaire

Mars 2007

SOMMAIRE

	Page
1 - INTRODUCTION	4
2 - ACTIVITES D'EXPERTISES	6
2-1 Capacités techniques du CNR	6
2-2 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie 2006.....	8
2-2-1 Souches d'origine humaine	9
2-2-2 Souches d'origine vétérinaire	9
2-2-3 Souches d'origine « industrielle ».....	10
2-3 Activités d'expertise sur la toxine botulique	11
2-3-1 Sérums neutralisants des toxines botuliques.....	11
2-3-2 Protocole d'utilisation des sérums neutralisants pour le diagnostique du botulisme	12
2-3-3 Anticorps monoclonaux neutralisants des neurotoxines botuliques A, B, C, et E	13
2-4 Génotypage des souches de <i>Clostridium botulinum</i>	13
3 - ACTIVITES DE SURVEILLANCE	14
3-1 Surveillance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux	14
3-2 Surveillance du botulisme	14
3-2-1 Botulisme humain	15
3-2-2 Botulisme agro-alimentaire.....	17
3-2-3 Botulisme animal.....	17
3-3 Surveillance des caractéristiques des infections à <i>Clostridium difficile</i>	20
3-4 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux...	21
4 - ALERTE.....	22
5 - ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION, ET DE CONSEIL.	23
5-1 Enseignements.....	23
5-2 Stagiaires.....	23
5-3 Guide de diagnostic du botulisme.....	24
5-4 Diffusion aux professionnels de santé	24
6 - ACTIVITES DE RECHERCHE	34
6-1 Activités de recherche en relation avec le CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme.....	24
6-2 Activités de recherche de l'Unité Bactéries Anaérobies et Toxines	27
7 - PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS.....	36
8 - ANNEXES	39
- Tableau 1 : Nombre de demandes d'identification de souches par département.....	39

-	Tableau 2 : Répartition des souches humaines par sites d'infections.....	40
-	Tableau 3 : Souches d'origine humaine : Répartition par genres.....	41
-	Tableau 4 : Souches d'origine humaine : Répartition par espèces	41
-	Tableau 5 : Souches d'origine vétérinaire : Répartition par espèces.....	43
-	Tableau 6 : Souches d'origine industrielle : Répartition par espèces.....	43
-	Tableau 7 : Botulisme humain : Nombre de cas et de foyers.....	44
-	Tableau 8 : Recherche d'anticorps antibotuliques	45
-	Tableau 9 : Botulisme animal : Répartition par espèces.....	45
-	Tableau 10 : Recherche de botulisme chez les bovins	46
-	Tableau 11 : Botulisme des oiseaux d'élevage.....	47
-	Tableau 12 : Botulisme des oiseaux sauvages.....	48
-	Tableau 13 : Recherche de botulisme aviaire.....	49
-	Figure 1 : Botulisme aviaire 2006.....	50

* * * * *

1 - INTRODUCTION

Le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme (CNRAB) a pour mission, selon le cahier des charges défini par l'Institut de Veille Sanitaire (InVS), d'une part, la surveillance des infections à bactéries anaérobies (identification des souches transmises par les laboratoires hospitaliers et les laboratoires d'analyses médicales, détermination de la sensibilité aux antibiotiques, investigation et alerte à l'InVS des affections graves à anaérobies notamment à *C. difficile*) et d'autre part le diagnostic et la surveillance du botulisme en relation avec l'InVS. De plus, des actions plus spécifiques sur la toxine botulique et le diagnostic du botulisme ont été attribuées à ce Centre, notamment production des antisérums spécifiques permettant la caractérisation des toxines botuliques.

Le CNRAB accueille, dans la limite de ses disponibilités, des stagiaires désireux de compléter leur formation en bactériologie anaérobie. Nous participons également à divers cours et enseignements dans ce domaine.

Le CNRAB conduit des thèmes de recherche en relation avec ses activités d'expertise, notamment en taxonomie et identification des bactéries anaérobies (développement de nouvelles techniques basées sur la spectrométrie infrarouge à transformée de Fourier, sur le séquençage des gènes des ARN ribosomiaux 16S).

L'Unité de recherche sur les *Clostridium* toxinogènes est constituée d'un chef de laboratoire, d'un chercheur INSERM, d'une technicienne et de stagiaires thèse et postdoc, englobe le CNR des Bactéries anaérobies et botulisme. Elle a pour principaux thèmes de recherche : *Clostridium botulinum* (régulation de la toxinogénèse et passage de la neurotoxine à travers la barrière intestinale) et les toxines de *Clostridium* modifiant le cytosquelette d'actine.

Depuis décembre 2006, notre entité est reconnue comme l'Unité d'Expertise et de Recherche des Bactéries anaérobies et Toxines au sein de l'Institut Pasteur, dont fait partie le CNR des Bactéries Anaérobies et Botulisme.

RESUME DES ACTIVITES 2006

Le CNR a participé à la surveillance du botulisme en France en 2006 (179 échantillons de sérums, 17 de selles, 50 agro-alimentaires). Un total de 5 cas (2 de type A, 3 de type B) et 3 douteux (1 type B et 2 de type indéterminé) correspondant à 7 foyers ont été diagnostiqués. Un cas de botulisme A était une forme infantile et l'autre cas concernait un adulte en relation avec la consommation d'une terrine familiale. Un foyer de type B a été identifié chez deux jeunes de 28 ans à la suite d'inhalation de cocaïne. L'origine des autres cas n'a pas été déterminé.

Le botulisme animal de type C et/ou D (283 analyses au total) a été identifié dans 7 élevages de bovins, 56 foyers d'élevage aviaire, et 32 foyers d'oiseaux sauvages. Ce botulisme qui est dépendant des conditions climatiques, était en baisse en 2006 par rapport aux années précédentes.

Le CNR a identifié 345 souches de bactéries anaérobies d'origine humaine et 108 d'origine vétérinaire ou industrielle, se répartissant en 17 genres et 53 espèces distinctes. Le fait majeur en 2006 est une recrudescence des affections nosocomiales à *C. difficile*, du moins dans certains hôpitaux, probablement liée au développement de clones particuliers, comme le PCR-ribotype 027. Les techniques d'identification des marqueurs épidémiologiques de *C. difficile* ont été développées, et un réseau de laboratoires experts appuyé par un site informatique et en relation avec l'InVS a été constitué.

Des travaux d'expertise ont porté sur la préparation de sérums neutralisants des toxines botuliques (A à G) à l'aide d'antigènes recombinants, et le génotypage des souches de *C. botulinum*. De nouvelles techniques d'identification et de titrage des toxines botuliques sont en cours d'étude.

Les activités de recherche en relation avec le CNR ont permis la caractérisation de nouvelles espèces de bactéries anaérobies (*Moorella*, *Thermonanaerobacter*, *Clostridium amygalinum*).

Les travaux de recherche de l'Unité concerne les toxines botuliques (passage à travers la barrière intestinale), les toxines binaires (mécanisme d'entrée dans les cellules), et les toxines de grande taille, toxines de *C. sordellii* et *C. difficile* (pathogénicité *in vivo*, activité sur les barrières épithéliales).

DEMARCHE QUALITE

L'ensemble des modes opératoires et des procédures utilisés par le CNR est sous Assurance Qualité, ainsi que la gestion des réactifs, la gestion documentaire et le matériel. Les démarches "Qualité" concernant la métrologie (contrôle des températures des chambres chaudes et froides, congélateurs, réfrigérateurs et bain marie, ainsi que le contrôle de volume des pipettes automatiques) ont également été mises en place.

2 – ACTIVITES D'EXPERTISES

2 – 1 Capacités techniques du CNR

Liste des techniques de référence

- Techniques disponibles
 - Techniques standard d'identification des bactéries anaérobies : tests culturaux et morphologiques, tests de préidentification, tests biochimiques (fermentation de substrats carbonés, production d'enzymes hydrolytiques), analyse des produits du métabolisme et des acides gras cellulaires par chromatographie en phase gazeuse.
 - Spectroscopie infrarouge
 - Identification des gènes de toxines de *Clostridium* par PCR. Ces techniques ont été développées au CNR sur la base de gènes de toxines caractérisées dans notre Unité ou sur des gènes publiés.
 - Mise en évidence de toxine létale par le test sur souris et identification par séroneutralisation à l'aide de sérums neutralisants.
 - Mise en évidence de cytotoxine à l'aide culture cellulaire de différents types
 - Amplification des gènes ARN 16S et séquençage
 - Antibiorésistance en milieu gélosé et en milieu liquide selon les procédures développées au CNR.
 - Dosage de certaines toxines par ELISA (comme toxine epsilon de *C. perfringens*, toxine LT de *C. sordellii*, toxines botuliques)
- Techniques développées en 2006
 - Techniques des marqueurs épidémiologiques de *C. difficile*

Dans le cadre du réseau de laboratoires experts mis en place par le CNR des Bactéries Anaérobies et Botulisme pour la surveillance des infections à *Clostridium difficile*, un recueil

de protocoles standardisés pour la caractérisation des souches de *Clostridium difficile* a été rédigé par le CNR en collaboration avec le laboratoire de Bactériologie de l'Hôpital Saint-Antoine (UHLIN, Frédéric Barbut) et adressé à tous les laboratoires experts.

A cette fin, plusieurs techniques de typage ont été introduites au CNR durant l'année 2006 :

1. Technique de PCR-ribotypage qui est actuellement la technique principale permettant d'identifier le clone épidémique « 027 » et de différencier les souches entre elles lors d'une suspicion de cas groupés.
2. Mise en évidence d'une délétion dans le gène *tcdC* : un protocole d'amplification par PCR d'un fragment de 300 paires de bases (pb) interne au gène *tcdC* (150 bases de part et d'autre de la zone où les différentes délétions surviennent) a été élaboré au CNR et retenu par le réseau de laboratoires experts. Cette technique permet par amplification puis séparation sur un gel haute résolution en s'entourant de témoins, de différencier aisément les différents types de délétion du gène *tcdC* existants : 18 pb et 39 pb déjà décrits dans la littérature ainsi qu'une nouvelle délétion de 54pb non encore décrite et identifiée au CNR. Des études récemment publiées ayant identifié d'autres délétions (délétion ponctuelle à la position 117, délétion de 36bp...), le CNR confronté à une délétion du gène détermine systématiquement la séquence du gène *tcdC* en entier.
3. Amplification par PCR de l'opéron codant pour la toxine binaire CDT permettant la mise en évidence d'opérons tronqués et de nouveaux variants.

Des techniques déjà en place au CNR sont également utilisées pour parfaire la caractérisation des souches de *C. difficile* : détermination de la sensibilité à certains antibiotiques (érythromycine, clindamycine, métronidazole, moxifloxacine), détection par PCR des gènes *cdtA* et *cdtB* codant pour la toxine binaire, amplification des fragments A3 (gène *tcdA*), et B1 (gène *tcdB*) puis restriction par différentes enzymes pour détermination du toxinotype.

Technique ELISA de détection de la toxine LT de *C. sordellii*

La recherche de toxine LT de *C. sordellii* dans certains échantillons, comme des contenus intestinaux ou selles est occasionnellement demandée. Une technique ELISA basée sur des anticorps spécifiques de LT obtenus chez le lapin et la souris, a été développée.

- Techniques en développement

Techniques de titrage de la toxine botulique, voir chapitre "activités d'expertises"

Développement d'une puce ADN pour le génotypage des souches de *C. botulinum* (voir activités d'expertises, génotypage de *C. botulinum*)

Liste des marqueurs épidémiologiques

- couples de primers pour identifier les gènes de toxines et flagellines suivant :
 - gènes des neurotoxines botuliques (A à G) et des protéines associées aux complexes botuliques
 - gènes des toxines de *C. perfringens* : alpha, beta1, beta2, iota, enterotoxine, delta, epsilon.
 - gènes des toxines de *C. difficile* et de marqueurs épidémiologiques (voir ci-dessus)
 - gènes des toxines de *C. sordellii* (LT, HT), neuraminidase
 - gènes des toxine alpha de *C. septicum*, *C. oedematiens*
 - gènes des flagellines de *C. oedematiens*, *C. chauvoei*
 - gène de l'enterotoxine de *Bacteroides fragilis*
- couples de primers pour autres gènes d'intérêt :
 - gènes des ARN 16S
 - gènes de l'espace intergénique 16S – 23S
 - gènes de ménage *hsp60*, *hsp70* et *recA*
 - gènes de sporulation des *Clostridium*
 - gènes de résistance au métronidazole

Collection de souches, sérums de référence

- Collection de souches de bactéries anaérobies, comprenant les souches types pour chaque espèce. Ces souches sont conservées en azote liquide. Les souches types ainsi que les souches d'intérêt médical sont déposées à la Collection de l'Institut Pasteur. Les souches des espèces nouvellement décrites par le CNR sont également déposées dans une collection internationale étrangère (Culture Collection, University of Goteborg).
- Sérums de référence anti-toxine botulique (voir chapitre "activités d'expertises")

2 – 2 Activités d'expertise en bactériologie anaérobie 2006

Nature et nombre des souches analysées

La répartition des souches analysées en 2006 était la suivante :

- origine humaine	345
- origine vétérinaire	58
- origine industrielle, collections	50
Total :	453

2-2-1 – Souches d'origine humaine

La répartition des souches d'origine humaine selon l'origine géographique par département est présentée au Tableau 1.

Une plus grande demande d'analyses de certains départements est en relation avec le nombre et l'importance de Centres Hospitaliers dans ces régions et aussi avec une plus grande motivation pour les bactéries anaérobies apportée par certains responsables de laboratoire.

La distribution des souches de bactéries anaérobies selon les sites d'infections est présentée au Tableau 2.

Dans la moitié des cas environ, l'origine médicale des souches n'a pas été précisée. La majorité des souches dont nous avons des renseignements cliniques provient par ordre d'importance décroissante de coproculture (44%), d'hémoculture (31%), de suppurations cutanées ou osseuses (13 %), urologie-gynécologie (10 %), ORL et pulmonaire (2 %) et divers.

Les souches de bactéries anaérobies identifiées se répartissent en 17 genres différents (Tableau 3). Les *Clostridium* sont les plus fréquemment rencontrés (61 %) dont les souches de *C. difficile* envoyées pour toxinotypage. Puis par ordre décroissant ces souches se répartissent dans les différents genres *Actinomyces-Propionibacterium- Eubacterium* (3,5 %), *Bacteroides-Porphyrromonas-Prevotella* (7%), cocci anaérobies (1 %), et *Fusobacterium* (5,5 %) et divers.

L'identification selon les espèces bactériennes anaérobies est rapportée au Tableau 4. La particularité cette année est le plus grand nombre de souches de *C. difficile*.

2-2-2 – Souches d'origine vétérinaire

Les souches d'origine vétérinaire qui nous sont adressées sont essentiellement des *Clostridium*, la majorité étant des *C. perfringens* (93 %) (Tableau 5). Dans la plupart des cas, ces souches nous sont envoyées pour déterminer le typage toxinique. Celui-ci est réalisé par le test sur souris et amplification génique.

Les types toxiques de *C. perfringens* responsables d'affections chez les animaux sont généralement différents de ceux rencontrés chez l'homme. Mais, les animaux peuvent être porteurs de types de *C. perfringens* potentiellement pathogènes pour l'homme, comme les souches entérotoxigènes à l'origine des toxi-infections alimentaires. La surveillance de telles souches dans les élevages est un moyen de prévenir les risques.

Le typage des souches toxigènes de *Clostridium* en particulier de *C. perfringens* est réalisé par PCR à partir des séquences des gènes de toxines connus. Les nouveaux gènes de toxines comme les gènes des toxines Beta2 et delta qui ont été identifiés et caractérisés dans notre laboratoire, sont inclus dans le toxinotypage de routine. Les données

épidémiologiques récoltées au CNR montrent que la toxine Beta2 est un facteur de pathogénicité déterminant dans l'entérocolite des porcelets et certaines colites des chevaux. Par contre, son rôle dans les pathologies digestives des autres espèces comme les bovins n'est pas encore établi. Les souches de *C. perfringens* possédant le gène de la toxine Beta2 se rencontrent également chez l'homme, mais leur pouvoir pathogène reste à déterminer. Le gène de la toxine delta est retrouvé chez quelques souches de *C. perfringens* qui produisent également la toxine Beta1.

Les affections à *C. perfringens* restent un problème préoccupant dans les élevages, notamment dans les élevages de volailles suite à l'interdiction des antibiotiques et anticoccidiens comme additifs dans l'alimentation. Nous sommes régulièrement sollicités pour des typages des souches de *C. perfringens* d'origine animale ou pour participer à des enquêtes dans les élevages à problème.

2-2-3 – Souches d'origine "industrielle"

Un total de 50 souches, classées "industrielles", c'est à dire non médicales et non vétérinaires, nous ont été adressées par divers laboratoires, tels que laboratoires de collections, laboratoires du secteur agroalimentaire, laboratoires pharmaceutiques, laboratoires départementaux. Ces demandes d'analyse concernaient des confirmations d'identification, toxinotypie, identification de souches toxigènes au cours d'enquêtes épidémiologiques pour préciser l'origine d'intoxications alimentaires botuliques ou dues à des *C. perfringens*, identification de contaminants dans des préparations pharmaceutiques, caractérisation de souches à usage vaccinal ou industriel. La grande majorité des souches identifiées d'origine industrielle appartiennent au genre *Clostridium* (Tableau 6). La plupart sont des *Clostridium* protéolytiques ou thermophiles, parmi lesquels les souches toxigènes représentent un risque important pour la sécurité des produits alimentaires et pharmaceutiques. Les bactéries anaérobies thermophiles constituent un problème technologique dans les conserves traitées par la chaleur et leur position taxonomique reste encore imprécise. La compétence du CNRA est requise pour une identification précise et complète de ces souches qui souvent ont fait l'objet d'une première analyse par un laboratoire local.

2 – 3 Activités d'expertise sur la toxine botulique

2-3-1 – Sérums neutralisants des toxines botuliques

Antigènes recombinants des neurotoxines botuliques

Les sérums neutralisants spécifiques de chaque type de toxine botulique sont indispensables dans le test de létalité sur souris qui reste la méthode la plus sensible pour le diagnostic du botulisme. Ces sérums n'étant plus commercialisés, il est prévu que nous préparions de nouveaux stocks. Ces sérums étaient traditionnellement préparés à l'aide de toxines brutes produites par des souches sauvages de *C. botulinum* et détoxifiées par le formol. Il a été montré que la partie immunogène des neurotoxines correspond à la partie C-terminale (fragment Hc). Pour des raisons de sécurité et pour pallier les différences de production de toxines selon les souches des différents types, il s'avère plus judicieux de produire des antigènes recombinants qui sont dépourvus de toute toxicité. Nous avons préparé un vecteur pour la production du fragment Hc de type A, et nous avons testé son pouvoir protecteur dans un modèle souris. Des résultats identiques à ceux publiés par un autre groupe ont été reproduits. Un sérum neutralisant chez le lapin a aussi été obtenu. Nous avons également recherché si un domaine plus petit que le fragment Hc, tel que le sous-domaine Hc-N ou Hc-C (moitié N- ou C-terminale, respectivement) pouvait induire des anticorps neutralisants (voir paragraphe 3 de la section "activités recherche"). Les résultats les plus satisfaisants ont été obtenus avec le fragment Hc entier. Ainsi, le titre neutralisant d'un lapin immunisé avec Hc de la toxine botulique A était de 20000 unités neutralisantes par ml, alors que le sous domaine Hc-N induisait un titre de 200, et Hc-C un titre de 2000 unités neutralisantes par ml. Cette stratégie a été adoptée pour préparer des antigènes recombinants pour les toxines botuliques.

Les gènes codant pour les domaines Hc des neurotoxines botuliques B, C1, D, E, F et G ont été amplifiés par PCR et clonés dans le vecteur pCR2 qui est adapté au clonage des fragments PCR. Les séquences des ADN clonés ont été contrôlées par séquençage ADN pour s'assurer qu'aucune mutation n'ait été introduite au cours de l'amplification par PCR. Les fragments d'ADN ont été ensuite sous clonés dans le vecteur d'expression pET28 grâce aux sites de restriction (*EcoRI-SalI*) apportés par les primers utilisés pour la PCR. Actuellement, l'ensemble des gènes des domaines Hc des neurotoxines botuliques A à G ont été clonés individuellement dans le vecteur d'expression pET28 et vérifiés par séquençage ADN.

La production des protéines recombinantes a été réalisée chez *E. coli* cultivé en fermenteur. Les protéines ont été purifiées par colonne cobalt et vérifiées en gel de polyacrylamide. Trois lapins ont été immunisés avec les fragments recombinants Hc de

chaque type de neurotoxine botulique. Les sérums des lapins immunisés ont été titrés par ELISA et leur activité neutralisante a été déterminée par le test de létalité sur souris et neutralisation. Pour cela, des toxines botuliques de chaque type ont été produites et titrées par dilution par le test sur souris. Des doses de 5 doses létales souris ont été utilisées pour calibrer l'activité neutralisante de chaque sérum. Les résultats ont été exprimés en Unités Internationales par ml. Des stocks de sérums neutralisants ont été préparés pour les neurotoxines botuliques A, B, C, D et E. Les sérums anti neurotoxine botulique F et G sont en cours de titrage.

Préparation et stocks de sérums polyclonaux neutralisants anti-toxines botuliques

Une première série d'immunisation de 3 lapins par type d'antigène recombinant a été réalisée. Chaque lapin a reçu 5 à 6 injections espacées de 1 à 2 mois. Les cinétiques d'apparition d'anticorps neutralisants réalisées avec le fragment Hc de la neurotoxine botulique A et B ont montré qu'un niveau élevé était atteint dès la 3^o immunisation et que les immunisations ultérieures induisaient des augmentations faibles de titre

L'activité neutralisante des sérums a été testée par le test de létalité sur souris et séroprotection. Au préalable, des échantillons de toxine botulique A, B, C, D et E ont été calibrés à un titre de 10 Doses Létales souris par ml. Il faut noter que cette étape est particulièrement fastidieuse et longue. Un protocole de titrage des activités neutralisantes a été développé et les résultats sont exprimés en Unités Internationales (UI/ml).

Les sérums ont également été titrés par un test ELISA. Pour cela, des plaques plastique de 96 puits ont été coatées avec le fragment Hc recombinant correspondant (1 µg/ml). Les sérums à tester ont été dilués de 2 en 2 en tampon PBS-Tween-Gélatine, et les immunoglobulines anti-Hc ont été révélées à l'aide d'un conjugué protéine A couplée à la peroxidase. Les lectures ont été faites après addition d'ortho-phénylène-diamine, au spectrophotomètre à 490 nm.

Une réponse élevée en ELISA a été obtenue pour chacun des sérums anti-toxine botulique dès la 3^o immunisation. Ces titres ELISA ne sont pas corrélables avec les titres en neutralisation.

2-3-2 – Protocole d'utilisation des sérums neutralisants pour le diagnostic du botulisme.

Un protocole détaillé pour le diagnostic du botulisme par mise en évidence de la toxine botulique et de *Clostridium* neurotoxigène dans des échantillons biologiques et alimentaires à l'aide des sérums neutralisants et PCR, a été rédigé.

2-3-3 – Anticorps monoclonaux neutralisants des neurotoxines botuliques A, B, C et E.

L'objectif est de sélectionner des anticorps monoclonaux de la neurotoxine botulique A, B, C et E ayant un titre neutralisant élevé qui pourraient être utilisables dans la thérapeutique du botulisme. Les fragments Hc recombinants des neurotoxines botuliques A, B, C et E ont été choisis comme antigène au vu de résultats concluants dans des essais préliminaires.

2 – 4 Génotypage des souches de *Clostridium botulinum*

Les souches de *C. botulinum* sont divisées en 7 types (A à G) selon les propriétés antigéniques des toxines botuliques produites. Cependant, l'analyse génétique des gènes qui forment les locus botuliques montre une plus grande variabilité de ces souches. Afin de mieux connaître les variations génétiques et permettre la traçabilité des souches de *C. botulinum* ainsi que d'améliorer les méthodes de détection et d'identification, une étude a été entreprise avec les souches en collection et nouvellement isolées au CNR Anaérobies.

Cette étude comporte d'une part, le séquençage des gènes des toxines botuliques. Pour cela, le gène de la toxine botulique de chaque souche est amplifiée par PCR sous forme de 3 à 4 fragments chevauchants qui sont soumis au séquençage ADN. Les séquences obtenues sont ensuite analysées et comparées avec celles déposées dans les banques de données.

D'autre part, un génotypage de chaque souche est effectué par identification par PCR des gènes associés à celui de la toxine botulique et formant les locus botuliques. Ces gènes codent pour des protéines (hémagglutinines, protéine non-toxique et non-hémagglutinine, p47, ...) qui s'associent à la toxine botulique pour former les complexes botuliques ou qui interviennent dans la régulation de l'expression des gènes de la toxine botulique (BotR). La composition génétique des locus botuliques est variable selon les types et sous-types de *C. botulinum*.

En 2005, 10 souches de *C. botulinum* ont été ainsi analysées (6 souches de *C. botulinum* E et 4 souches de *C. botulinum* A), et en 2006 10 autres souches de type B.

Etant donné le grand nombre de gènes à analyser pour obtenir un génotypage de *C. botulinum*, une méthode par puce ADN est en cours de développement.

3 – ACTIVITES DE SURVEILLANCE

3 – 1 Surveillance des bactéries anaérobies aux anti-infectieux

Les laboratoires ne nous demandent que très rarement la réalisation d'un antibiogramme. 24 ont été réalisés au cours de l'année 2006. En effet, les bactéries anaérobies ne présentent généralement pas de résistance aux anti-infectieux anaérobies. Le métronidazole étant une thérapeutique de choix contre les affections à bactéries anaérobies.

Certaines espèces, principalement dans les genres *Bacteroides* et *Fusobacterium* produisent des bêtalactamases ou des céphalosporinases et sont de ce fait naturellement résistantes à ce groupe d'antibiotiques. D'autres peuvent acquérir des gènes de résistance aux 5-nitroimidazolés (gènes *nim*).

Nous avons examiné 116 souches d'origine humaine vis-à-vis de leur sensibilité au métronidazole, et à la vancomycine.

18 souches présentaient une résistance au métronidazole.

Ces souches étaient soit des bactéries aérobies ou microaérophiles soit appartenaient aux genres *Propionibacterium* et *Actinomyces*, toutes bactéries pour lesquelles le métronidazole est inactif. Deux souches de *Prevotella* étaient résistantes à cet antibiotique. La recherche des gènes *nim* s'est révélée négative. L'analyse du rDNA 16S montre que ces souches appartiennent à une nouvelle espèce *Prevotella nanceiensis*.

Certains *Clostridium* peuvent présenter une sensibilité diminuée à la vancomycine. Nous avons identifié une souche de *Clostridium clostridioforme* et une souche de *Clostridium subterminale* présentant cette caractéristique.

En 2007, un antibiogramme standard selon les recommandations du Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie a été mis en place en routine.

3 – 2 Surveillance du botulisme

Le volume global d'activité en relation avec le botulisme est le suivant :

	Nombre d'échantillons
Botulisme humain (sérum)	179
Botulisme humain (selles)	17
Liquide gastrique, urines	5
Aliments et échantillons d'environnement	50
Recherche d'anticorps antitoxine botulique dans des sérum humains	12
Botulisme animal	283
Total :	546

3-2-1 – Botulisme humain

Réseau de partenaires

Les échantillons, essentiellement sérums humains, nous sont adressés par l'intermédiaire des laboratoires hospitaliers ou laboratoires d'analyses privés sur demande du clinicien ou praticien traitant dans le cadre d'une suspicion de botulisme clinique ou pour étayer un diagnostic différentiel d'un syndrome nerveux paralytique.

La répartition des partenaires s'étend sur toute la France. Certaines demandes d'analyse de botulisme proviennent de l'étranger.

Analyse des cas de botulisme humain

Un total de 179 sérums équivalent à ceux des années précédentes (178 en 2005, 168 en 2004, 194 en 2003, 148 en 2002, 135 en 2001, 127 en 2000) et de 17 selles de patients suspects de botulisme ont fait l'objet d'identification de botulisme en 2006 (Tableau 7).

La présence de toxine botulique est recherchée dans le sérum ainsi que dans les échantillons d'aliment par le test de létalité sur souris et de séro-protection à l'aide d'anticorps spécifiques. Les tests ELISA, proposés pour la recherche de toxine botulique ont une sensibilité inférieure à celle du test sur souris, et ils ne sont pas utilisables pour ce type d'échantillons.

C. botulinum est recherché dans les selles et les aliments suspects par culture d'enrichissement et amplification génique selon un protocole développé au laboratoire. L'isolement des souches de *C. botulinum* est entrepris pour chaque échantillon positif de façon à obtenir une caractérisation détaillée des souches et du type de botulisme en cause.

8 cas dont 3 douteux correspondant à 7 foyers (2 douteux) ont été diagnostiqués en 2006. Ces données indiquent une incidence plus faible de botulisme en France par rapport aux années précédentes : 2005 (25 cas, 20 foyers), 2004 (19 cas, 15 foyers), 2003 (41 cas, 23 foyers), 2002 (21 cas, 14 foyers), 2001 (27 cas, 23 foyers), 2000 (14 cas, 12 foyers), 1999 (24 cas, 19 foyers).

L'origine géographique des cas de botulisme était variée (Gironde, Isère, Landes, Rhône, Savoie, Région parisienne), sans prédominance d'apparition de foyers de botulisme dans un département particulier.

Dans 2 cas il s'agissait de botulisme de type A, dans 3 autres cas de type B, et dans 3 cas douteux le typage n'a pas pu être déterminé.

Un cas de botulisme de type A était une forme de botulisme infantile concernant un nourrisson de 2 mois de sexe féminin dans le département de l'Isère. La toxine botulique a été détectée dans le sérum du nourrisson et la présence de *C. botulinum* A a été mise en évidence dans l'échantillon de selles. La souche de *C. botulinum* a été isolée et est en cours de

caractérisation. Le miel qui était distribué à l'enfant a été suspecté être à l'origine de cette contamination. Les analyses effectuées sur un échantillon de miel provenant d'un pot qu'avait consommé en partie le nourrisson n'ont pas révélé de présence de *C. botulinum*.

Le deuxième cas de botulisme de type A concernait un adulte de 32 ans, sexe masculin, du département de la Savoie. La toxine botulique a été détectée dans le sérum et dans un prélèvement de selles du malade mais pas dans un prélèvement de liquide gastrique. Une souche de *C. botulinum* type A, sous type A2, a été isolée du prélèvement de selles. L'origine du botulisme était une terrine de fabrication familiale où une toxine botulique de type A (2 10⁵ Doses létales Souris par gr) a été mise en évidence et une souche de *C. botulinum* A a été isolée.

Un cas de botulisme de type B a été diagnostiqué chez un adulte de 44 ans, de sexe masculin, du département du Rhône. La toxine botulique B a été identifiée dans le sérum du malade. Aucun aliment suspect n'a été reçu pour analyse.

Un foyer de botulisme de type B concernait deux jeunes adultes (28 et 29 ans) de sexe masculin, région de Bordeaux. La toxine botulique B a été détectée à un faible niveau dans le sérum d'un des deux malades qui présentaient des signes cliniques identiques. Il faut noter que l'échantillon de sérum du deuxième malade avait été prélevé tardivement après l'apparition des signes cliniques. Ces deux jeunes étaient des toxicomanes qui inhalaient de la cocaïne depuis plusieurs années. Les symptômes sont apparus suite à l'achat de cocaïne à un nouveau dealer pour la première fois, et ils ont développé une forme bénigne de botulisme. Il s'agit du premier foyer de botulisme identifié biologiquement chez des toxicomanes en France.

Trois autres cas de botulisme étaient douteux.

Un cas de botulisme de type B a été suspecté chez un adulte de 40 ans, sexe masculin, de la région parisienne, pas mise en évidence de toxine dans un échantillon de sérum. Des prélèvements supplémentaires de sérum ont été demandés pour confirmer ce cas, mais n'ont pas été reçus.

Un foyer a été suspecté chez un couple de personnes âgées de 70 et 73 ans, du département des Landes. Une présence de toxine botulique à un faible niveau et non typable a été détectée dans le sérum des deux personnes, ainsi que dans les selles d'un des patients. Aucune souche de *C. botulinum* n'a été isolée des selles. Une conserve d'asperge familiale a été suspectée, mais les recherches de toxine et de *C. botulinum* ont été négatives.

Un botulisme a été suspecté chez une personne de 61 ans de la région parisienne, sexe féminin. Une activité toxique à un faible niveau (inférieur à une dose létale souris par ml) a été détectée dans un premier échantillon de sérum. Mais aucune toxicité n'a été décelée dans

un deuxième échantillon prélevé quelques jours plus tard. Aucun aliment suspect n'a été mis en cause.

Une activité toxique, non neutralisable par les sérums anti-botuliques a été détectée dans le sérum d'au moins 4 personnes présentant des signes de paralysie musculaire, souvent associés à des troubles oculaires. Ces analyses avaient été demandées pour étayer un diagnostic différentiel de neuropathies paralysantes, et ont permis d'orienter les cliniciens vers un diagnostic de neuropathies autoimmunes de type syndrome Guillain-Barré ou Miller-Fisher.

Nous avons été sollicités pour confirmer un diagnostic de botulisme chez une personne hospitalisée (82 ans) en soins intensifs à Zurich. Une toxine botulique de type A a été mise en évidence dans le sérum de cette patiente.

Recherche et dosage d'anticorps anti-toxine botulique A

La toxine botulique A est de plus en plus employée pour traiter des myoclonies telles que blépharospasme, torticolis, paralysie hémifaciale. Il faut noter que les indications d'utilisation de toxine botulique s'élargissent de plus en plus. Cependant, certains sujets acquièrent une résistance à ce traitement après plusieurs injections de toxine botulique.

Dans certains cas, cette résistance est attribuée à l'apparition d'anticorps neutralisants au cours du traitement.

En 2006, nous avons analysé 12 sérums de malades traités à la toxine botulique pour la recherche d'anticorps neutralisants (Tableau 8).

Des anticorps neutralisant anti-toxine botulique A ont été détectés dans un sérum.

3-2-2 – Botulisme agro-alimentaire

En plus des analyses d'aliment directement suspecté dans des cas de botulisme humain (voir précédemment), des échantillons agro-alimentaires nous ont été adressés pour recherche de botulisme. Il s'agissait de contrôles de l'industrie agro-alimentaire, d'échantillons d'aliments ou d'environnement suspectés responsables de botulisme animal, ou de produits destinés à l'exportation avec une demande spécifique de détection de *C. botulinum*. Sur 50 échantillons, *C. botulinum* C a été retrouvé dans 3 (déchet de brasserie, et 2 échantillons de sédiment de plan d'eau).

3-2-3 – Botulisme animal

Un total de 283 analyses a été réalisé, correspondant à des suspicions de botulisme animal, toutes espèces confondues (Tableau 9).

Réseau de partenaires

Les demandes de diagnostic de botulisme animal nous sont adressées par l'AFSSA, Laboratoires vétérinaires départementaux, Laboratoires vétérinaires privés ou de coopératives agricoles, Vétérinaire praticiens, Fédération de chasseurs.

Botulisme bovin

Le botulisme bovin est endémique dans l'Ouest de la France depuis les années 1980. Il faut noter que cette affection ne s'est pas développée dans les autres régions françaises. De rares cas ont été diagnostiqués dans d'autres départements que ceux de Bretagne, Normandie et pays de la Loire.

La forte densité des animaux d'élevage dans ces départements est favorable à la persistance de cette maladie. Un des principaux facteurs de risques concerne la proximité d'élevages industriels de volailles avec ceux de bovins, et les épandages de lisiers de volailles sur les pâtures destinées aux bovins. Les volailles sont résistantes au botulisme D, mais elles peuvent être des porteurs sains et contaminer les lisiers.

Des échantillons (total 35) de 21 bovins nous ont été adressés pour réaliser un diagnostic de botulisme, dont 7 se sont révélés positifs (20 %), quatre de type C, deux de type D, et un de type C ou D (Tableaux 9 et 10). Le nombre d'analyses est stable ces dernières années (37 échantillons en 2005, 41 en 2004, 25 échantillons en 2003, 28 échantillons en 2002, 78 échantillons en 2001). Nous avons été très sollicité pour le diagnostic du botulisme bovin avant les années 2000. Depuis, des laboratoires vétérinaires départementaux auxquels nous avons transféré les protocoles d'analyse, ont pris le relais du diagnostic biologique du botulisme bovin. Nous intervenons essentiellement à la demande de certains laboratoires, pour expertiser des cas litigieux.

Botulisme des oiseaux d'élevage

Le botulisme aviaire apparaît occasionnellement dans des élevages industriels, ce qui constitue un risque de santé publique pour l'homme.

Le nombre d'examen (156 en 2006) pour le diagnostic du botulisme des oiseaux d'élevage est en sensible augmentation par rapport à ceux des années précédentes 2005 (126), 2004 (81), 2003 (69), 2002 (54), 2001 (46), 2000 (54), 1999 (73) et 1998 (71). Le nombre de foyers à botulisme est aussi en augmentation 56 (56%), par rapport aux autres années: 50 (53%) en 2005, 39 (48%) en 2004, 33 (48%) en 2003, 16 (29%) en 2002, 10 (22%) en 2001, 20 (37%) en 2000, 26 (35%) en 1999, et 20 (28%) en 1998.

Parmi les 56 foyers de botulisme en élevage industriel de volailles, 2 étaient de type C, 2 de type D, 37 de type C ou D, 15 de type indéterminé. Les résultats notés type C ou D

proviennent du fait que l'activité toxique était neutralisée à la fois par le sérum C et le sérum D. Ces deux types de toxines sont très proches et il existe une certaine neutralisation croisée avec ces sérums correspondants, d'où la difficulté d'identifier correctement ces types de toxines botuliques. Les foyers botulisme de type C ou Cou D concernaient des élevages de poulet, canard, dindon, faisan ou perdreau. Aucun foyer de botulisme E n'a été diagnostiqué en élevage de volailles en 2006 (Tableau 11).

Le botulisme de type C ou D est rarement rencontré chez l'homme. Cependant, il a été montré que l'homme est sensible à ce type de botulisme. Il n'est pas exclu qu'une progression de l'incidence de botulisme C chez les oiseaux avec des risques de contamination des aliments, entraîne des cas humains.

Le botulisme des oiseaux d'élevage se déclare tout au long de l'année avec une plus forte incidence au printemps et en été (Fig. 1).

Botulisme des oiseaux sauvages

Les cas de botulisme d'oiseaux sauvages analysés en 2006 sont rapportés au Tableau 12. Le nombre d'examen, 72 en 2006 est en baisse par rapport à celui des années précédentes (109 en 2005, 86 en 2004, 138 en 2003, 43 en 2002, 29 en 2001, 57 en 2000, 111 en 1999 et 56 en 1998). Ces demandes d'analyse sont fonctions des conditions climatiques. La plus forte demande avait été enregistrée au cours de l'été particulièrement chaud de 2003. La proportion des cas positifs en fonction du nombre total d'examen a progressé significativement ces dernières années et semble se stabiliser : 25% en 1998, 39% en 1999, 49% en 2000, 47% en 2001, 37% en 2002, et 50% en 2003, 35% en 2004, 45% en 2005, 44% en 2006. Ceci traduit probablement une meilleure connaissance de la maladie sur le terrain et un meilleur ciblage des échantillons qui nous sont envoyés pour analyse. Le nombre de foyers de botulisme des oiseaux sauvages est stable ces dernières années: 2006 (32), 2005 (49), 2004 (30), 2003 (55), 2002 (14), 2001 (28) et 2000 (28), 1999 (44).

Le botulisme des oiseaux sauvages est de type C ou D. Le type D se rencontre principalement chez les palmipèdes (canards, cygnes).

Le botulisme des oiseaux sauvages est actuellement très commun dans tous les pays d'Europe. Les estimations vont de quelques dizaines de milliers à plusieurs centaines de milliers de mortalités selon les années. Il sévit essentiellement en période chaude (été et début de l'automne), et atteint principalement les oiseaux d'eau (canards...). Le botulisme des oiseaux sauvages a une incidence saisonnière plus marquée que celui des oiseaux d'élevage. La mortalité des oiseaux est souvent rencontrée aux abords de lacs ou autres points d'eau. La raréfaction des sites d'abreuvement en saison chaude concentre les oiseaux autour d'un nombre réduit de points d'eau disponibles. Ceci pose le problème d'une contamination de ces sites et d'une éventuelle transmission à l'homme par baignade, ou consommation des produits de la pêche.

Les résultats globaux d'identification de botulisme aviaire sont présentés au Tableau 13.

Divers

Des échantillons de diverses espèces animales tels que chien, chevaux, poisson, et faune sauvage, nous sont adressés pour un diagnostic de botulisme (Tableau 9).

3 – 3 Surveillance des caractéristiques des infections a *Clostridium difficile*

Création d'un réseau *Clostridium difficile*.

Clostridium difficile est une bactérie responsable de 15 à 25 % des diarrhées post-antibiotiques. C'est la première cause de diarrhées infectieuses nosocomiales chez l'adulte. Un clone particulier appelé PCR ribotype 027 a été identifié dans des infections sévères et épidémiques. Cette souche a d'abord été détectée au Canada et aux Etats-Unis, puis en Grande-Bretagne, en Belgique et aux Pays-Bas, plus récemment en France.

Afin d'assurer la surveillance de l'éventuelle dissémination de ce clone épidémique sur le territoire français, le Centre National de Référence des Bactéries Anaérobies et Botulisme a créé un réseau national de 5 laboratoires experts capables de réaliser le typage des souches de *Clostridium difficile*. Ce typage comporte :

- La confirmation du caractère toxigène de la souche par détection des fragments A³ et B¹ des toxines TcdA et TcdB - (1^{ère} étape du toxinotypage) ;
- La PCR ribotypage pour un résultat 027 Oui/Non ; si " non 027 ", caractère clonal ou non ;
- Antibiogramme (érythromycine, clindamycine, moxifloxacine, métronidazole).

La répartition géographique des laboratoires experts est faite de la façon suivante :

CNR : Régions Poitou-Charentes, Limousin, Aquitaine + Support aux autres laboratoires

Paris, Hôpital Saint-Antoine : Régions Nord – Pas de Calais, Picardie, Ile de France, Centre

Rouen, CHU Ch. Nicolle : Régions Haute-Normandie, Basse-Normandie, Bretagne, Pays de Loire.

Nancy, Hôpital Central : Régions : Alsace, Lorraine, Champagne-Ardenne, Bourgogne, Franche Comté.

Montpellier, Hôpital Arnaud de Villeneuve : Régions : Midi-Pyrénées, Languedoc-Roussillon, Auvergne

Nice, Hôpital de l'Archet : Régions : Provence-Alpes-Côte d'Azur, Rhône-Alpes

Une page web a été construite sur le site du CNR pour informer les centres de santé (hôpitaux, laboratoires, etc.) des modalités de fonctionnement de ce réseau et des procédures à suivre lors d'une infection à *Clostridium difficile*.

<http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/anaer/frame-anaer-activites.html#collaborations>

Le CNR avec la société Epiconcept a mis en place sur les serveurs de l'Institut Pasteur un site web permettant à chaque laboratoire expert d'enregistrer les caractéristiques des souches qui lui sont adressées et d'éditer un compte rendu de résultats.

L'ensemble des données collectées est accessible en temps réel au Responsable de l'Unité Infections Nosocomiales de l'InVS (B. Coignard). De plus chaque responsable des Cclin a accès aux informations concernant sa région.

Au 16 février 2007, 473 souches de *Clostridium difficile* ont été caractérisées par le réseau. 162 souches ont été identifiées au PCR-rybotype 027. Parmi elles 150 provenaient des départements Nord et Pas-de-Calais, les autres étant réparties sur les départements 06, 42, 57, 58, 69 et 94.

3 – 4 Détection et investigation des cas groupés et des phénomènes anormaux

Brève description des événements détectés et investigués notamment nosocomiaux en décrivant les apports du CNR (détection, comparaison de souches, expertise...)

Nous portons une attention particulière à certaines affections rares ou ré-émergentes à bactéries anaérobies comme le syndrome de Lemierre ou l'entérocolite ulcéronécrosante du prématuré.

Syndrome de Lemierre

La publication d'une note sur le syndrome de Lemierre dans le BEH (2006, N° 18) semble avoir sensibilisé les cliniciens et les laboratoires puisque que sur 9 souches de *Fusobacterium necrophorum* reçues au CNR en 2006, 5 provenaient de cas confirmés de syndrome de Lemierre, quatre autres ont été isolées d'hémocultures et une souche n'était pas documentée.

Le séquençage du rDNA 16S ne permet pas de lever l'ambiguïté sur la position taxonomique exacte de ces souches. Une seule correspondait à la souche type de *Fusobacterium necrophorum* ss *necrophorum* les autres étant plus proches d'une souche d'origine bovine ou d'une autre d'origine équine mais assez éloignées de *F. necrophorum* ss

necrophorum (jusqu'à 93% de similarité de séquences). Cette observation corrobore ce que nous avons déjà noté dans le BEH.

Entérocolite Ulcéro-Nécrosante

L'Entérocolite Ulcéro-Nécrosante (ECUN) est la plus fréquente des urgences digestives médico-chirurgicales néonatales. Cette pathologie a souvent été reliée à des bactéries pathogènes telles que des entérobactéries, mais surtout à des bactéries anaérobies.

En collaboration avec le Service de Néonatalogie de l'Institut de Puériculture de Paris, et le Centre de Ressource en Biostatistiques, Epidémiologie et Pharmaco épidémiologie appliquées aux Maladies Infectieuses de l'Institut Pasteur nous avons engagé une phase pilote.

- Registre des Entérocolites Ulcéronécrosantes du nouveau-né de la région Ile de France. Une demande a été faite auprès du Secrétariat de la Délégation Régionale à la Recherche Clinique dans le cadre de l'appel d'offre PHRC 2006. Celle-ci n'a pas abouti.

Nous avons donc entrepris dans un premier temps une étude plus restreinte avec une équipe hospitalière de Calais confrontée à des cas d'ECUN. Une étude microbiologique comparativement de selles provenant d'enfants prématurés atteints de cette pathologie et d'enfants sains est en cours.

Plusieurs souches de *Clostridium* ont été isolées. Elles appartiennent à l'espèce *Clostridium butyricum* et à une espèce phénotypiquement apparentée mais génétiquement différente « *Clostridium neonatale* ». Actuellement le nom de *Clostridium neonatale* n'est pas valide d'un point de vue taxonomique, mais cette espèce a été associée dans des cas d' ECUN au Canada (Clinical Infectious diseases 2002 ; 35 :S101-105). Aucun facteur de pathogénicité n'a été rapporté. Les souches canadiennes ainsi que nos isolats ne présentent pas d'activité toxique ou cytotoxique. Cependant, le nombre de cas est insuffisant pour définir le rôle de ces bactéries dans cette pathologie.

Afin de collecter un plus grand nombre de souches pour mieux caractériser les bactéries anaérobies impliquées dans ces affections et de renforcer leur surveillance nous avons lancé un appel aux microbiologistes hospitaliers par l'intermédiaire du Collège Bactériologie-Virologie-Hygiène.

4 – ALERTE

Les bactéries anaérobies ne sont généralement pas à l'origine de phénomènes épidémiques. Hormis le botulisme (maladie à déclaration obligatoire) et la surveillance du ribotype 027 de *Clostridium difficile*, il n'y a donc pas de procédure d'alerte pour les affections à bactéries anaérobies.

Botulisme : Chaque cas de botulisme confirmé biologiquement par le CNR fait l'objet d'une déclaration par fax à l'InVS. En outre, des contacts téléphoniques ou par courrier électronique ont lieu régulièrement entre l'InVS et le CNR pour faire le point sur les foyers de botulisme survenus dans la période précédente.

Les cas de suspicion de botulisme, mais non confirmés biologiquement font également l'objet d'une information par fax à l'InVS.

Clone de ribotype 027 de *Clostridium difficile* : Les laboratoires experts du réseau *Clostridium difficile* saisissent directement les résultats des souches reçues sur le site web du CNR. Ces données sont accessibles en temps réel au responsable de l'Unité Infections Nosocomiales de l'InVS. L'émergence du clone 027 ou de tout autre clone dans une région sera rapidement remarquée.

5 – ACTIVITES D'INFORMATION, DE FORMATION, ET DE CONSEIL

5 – 1 Enseignements

Nous organisons des cours de formation en bactériologie anaérobie pour les personnels techniques et cliniciens hospitaliers.

Nous participons à divers cours sur la bactériologie anaérobie et le botulisme organisés par les laboratoires hospitalo-universitaires ou agro-alimentaires.

5 – 2 Stagiaires

Le CNR reçoit pour des périodes de courte ou moyenne durée des stagiaires désireux de compléter leur formation en bactériologie anaérobie (techniques d'identification, d'analyse des produits du métabolisme par chromatographie en phase gazeuse et de biologie moléculaire).

5 – 3 Guide de diagnostic du botulisme

Elaboration d'un guide pour le diagnostic du botulisme par mise en évidence de la toxine botulique et de *Clostridium* neurotoxino-gènes dans des échantillons biologiques et alimentaires mis à la disposition de l'InVS.

5 – 4 Diffusion aux professionnels de santé :

Site web du CNR : <http://www.pasteur.fr/sante/clre/cadrecnr/anaer-index.html>

Site web spécifique à la surveillance de *Clostridium difficile*. Site réservé aux laboratoires du réseau, à l'InVS et aux Cclin.

Les demandes de renseignements ou de conseils se font directement par téléphone ou e-mail auprès des responsables du CNR.

6 – ACTIVITES DE RECHERCHE

6 – 1 Activités de recherche en relation avec le CNR Bactéries Anaérobies et Botulisme

Les laboratoires hospitaliers isolent de plus en plus souvent des bactéries anaérobies jusqu'alors méconnues ou inconnues. De ce fait, le CNR reçoit de plus en plus de souches atypiques dont l'identification est délicate, et de moins en moins de souches classiques. Environ 5% des souches reçues au CNR ne peuvent être rattachés à aucun taxon connu par la seule utilisation des tests phénotypiques couramment disponibles dans les laboratoires.

Les compétences du CNR couvrant la maîtrise des différentes techniques de culture de bactéries anaérobies, l'utilisation d'une grande variété de tests biochimiques conventionnels, l'analyse des métabolites bactériens et des acides gras cellulaires, l'analyse de l'ADN ribosomal 16S ou d'autres outils de biologie moléculaire permettent de mieux caractériser ces souches par une approche de taxonomie polyphasique.

I - Caractérisation phénotypique et génotypique d'espèces bactériennes rares isolées de cas cliniques.

En 2006 nous avons ainsi caractérisé plusieurs souches isolées de sites pathologiques mais qui étaient connues jusqu'à présent pour avoir comme habitat l'environnement. C'est le

cas de deux souches provenant d'infections postopératoires consécutives à des fractures ouvertes.

La première a été identifiée à un *Clostridium amygdalinum*, espèce isolée de station d'épuration et non connue comme espèce pathogène pour l'homme. Cette souche a été isolée chez un patient qui avait eu une antibiothérapie pendant deux mois suite à une première infection post opératoire. Une hyperthermie et l'absence de consolidation osseuse ont nécessité une seconde intervention chirurgicale au cours de laquelle la souche a été retrouvée à l'état pur. Le traitement antibiotique a été poursuivi avec une issue favorable.

Ce cas a été publié dans *Journal of Clinical Microbiology*.

La seconde souche provient d'un contexte médical très similaire mais sans aucun lien géographique. D'un point de vue génotypique elle est très similaire à la précédente mais s'apparente plus à une autre espèce, *Clostridium sulfatireducens*. Cette espèce très mal décrite a été isolée en Bolivie dans une source chaude et n'a jamais été mentionnée depuis. Nous n'avons pas publié ce cas car semblable au précédent, mais il faut retenir que ces bactéries que l'on peut qualifier d'exotiques sont à l'origine d'infections graves nécessitant plusieurs mois d'hospitalisation.

Nous ne pouvons pas faire ici une description exhaustive de toutes les bactéries étudiées, mais d'autres souches appartenant au genre *Clostridium* ou à des bactéries à Gram négatif ont été également caractérisées. En particulier, nous avons étudié plusieurs souches appartenant au phylum « *Synergistes* ». Les bactéries de ce phylum relativement récent sont connues comme faisant partie de la flore intestinale de différents mammifères. Elles n'étaient pas connues chez l'homme. Depuis quelques temps plusieurs souches sont isolées de différentes pathologies. Ces souches font partie d'un travail de taxonomie fait en collaboration avec le CHU de Montpellier (voir ci-dessous). Enfin, certaines bactéries appartiennent clairement à des genres ou espèces inconnues.

2. Collaborations internationales (voir aussi la partie taxonomie).

Nous avons participé à une étude pour le Dr. Stepanovic (Institute of Microbiology and Immunology School of Medicine, Belgrade, Serbie) sur des bactéries apparentées au groupe *Moraxella* / *Psychrobacter*. Bien que ces bactéries soient aérobies, S. Stepanovic a sollicité le CNR pour ces compétences dans la caractérisation bactériennes par méthodes biochimiques et moléculaires. Par analyse du rDNA 16S et de séquences signatures nous avons caractérisé en particulier une souche isolée d'une plaie chirurgicale après thrombectomie. Cette souche avait un phénotype typique de *Psychrobacter phenylpyruvicus* mais seulement 95% de similarité de séquence avec la souche type. A l'inverse, elle montrait

plus de 98% de similarité avec une souche atypique de *Moraxella phenylpyruvica* (souche 752/52). L'alignement des séquences en se référant à la numérotation d'*E. coli* montre que ces deux souches possèdent une cytosine en position 1336 à la place d'une adénine qui est la signature commune à toutes les souches du genre *Psychrobacter*.

Sur ces bases, nous avons considéré que ces deux souches représentaient une nouvelle espèce de *Psychrobacter phenylpyruvicus*. Ce travail a été publié dans *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*.

II – Taxonomie

Description d'un nouveau genre.

Comme dit plus haut, certaines bactéries ne peuvent être classées dans aucun genre connu. Deux souches isolées en France et une troisième envoyée par le Dr. Han (Anderson Cancer Center, Houston, USA) ont été caractérisées. Ces bactéries ont été isolées d'abcès intra abdominal ou cutanés. Elles sont Gram positif, anaérobies stricts. Elles présentaient près de 100% de similarité de séquences entre elles et formaient une lignée phylogénétique distincte dans le group *Clostridium coccoïdes*. Les espèces les plus proches étant *Clostridium clostridioforme*, *Clostridium boltae* et *Clostridium asparagiforme* avec 90-91,4% de similarité de séquences. Phénotypiquement, ces souches diffèrent de l'une ou l'autre de ces espèces par l'absence de spores, la production de butyrate et d'indole. Nous avons donc considéré qu'elles représentaient un nouveau genre : *Moryella indoligenes* (*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2007 ; 57 :725 - 729).

Description de nouvelles espèces

Collaboration avec les laboratoires de bactériologie des CHU de Montpellier et de Nancy: Suite de l'étude par approche polyphasique des bactéries appartenant à la famille des *Acidaminococcaceae* et étude d'un groupe bactérien dans le phylum "*Synergistes*".

Acidaminococcaceae :

Onze souches de cocci Gram négatif anaérobies ont été étudiées dans les deux laboratoires hospitaliers et au CNR. Ces souches isolées en majorité d'infections intra-abdominales, étaient phénotypiquement et morphologiquement apparentées à *Acidaminococcus fermentans* mais étaient phylogénétiquement distantes de cette espèce. Sur

la base des données génétiques, enzymatiques et des produits du métabolisme nous proposons une nouvelle espèce : *Acidaminococcus intestinalis*. Ce travail a été soumis à publication dans *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.

Nous avons également été sollicité ainsi que le Dr. Marchandin (CHU Montpellier) par le Dr. R. Byun (Institute of Dental Research, Wentworthville, Australia) pour effectuer une caractérisation par analyse phénotypique, génétique et des acides gras cellulaires de souches d'autres cocci anaérobies Gram négatif. Ce travail de coopération internationale a abouti à un manuscrit décrivant la nouvelle espèce de *Veillonella denticariosi* soumis dans le même journal.

Synergistes :

Des coccobacilles Gram négatif anaérobies strictes de culture extrêmement difficile sont régulièrement isolés de pathologies diverses (ORL, obstétrique, infections abdominales). Phylogénétiquement, ces bactéries sont proches d'une bactérie isolée du rumen de chèvre : *Synergistes jonesii*. Cette bactérie utilise certains acides aminés en particulier l'arginine et l'histidine et aurait un effet protectant chez le bétail en dégradant des acides aminés toxiques (System. Appl. Microbiol. 1992 ; 15 : 522-529).

Certaines des souches d'origine humaine ont des caractères phénotypiques semblables, en particulier en ce qui concerne l'utilisation des acides aminés. L'analyse des caractères phénotypiques et de la composition en acides gras cellulaires réalisée au CNR montre que ces souches sont distribuées dans trois groupes distincts pouvant représenter trois genres. Ces résultats sont corroborés par les caractères génomiques obtenus par l'équipe de Montpellier. Chacun de ces groupes semble avoir chez l'homme une niche écologique spécifique. Un manuscrit décrivant l'un de ces genres est en cours de préparation.

6 – 2 Activités de recherche de l'Unité Bactéries Anaérobies et Toxines

Passage de la toxine botulique A à travers la barrière intestinale (Travail de thèse de A. Couesnon).

Dans l'intoxication botulique classique, les neurotoxines botuliques (BoNT) transitent par voie digestive, traversent la muqueuse intestinale sans occasionner de lésions, et ensuite atteignent les extrémités nerveuses. Le mécanisme d'action des neurotoxines au niveau des neurones cibles est actuellement bien détaillé, par contre leur mode de passage de la barrière intestinale reste très méconnu. Les neurotoxines botuliques ont la particularité de s'associer à des protéines non toxiques pour former des complexes botuliques de grande taille.

Une des fonctions de ces complexes serait de permettre le passage de la neurotoxine botulique à travers la barrière intestinale. Une meilleure connaissance du mode de passage transépithélial devrait permettre de développer une nouvelle stratégie de prévention du botulisme par blocage de l'absorption digestive.

Transcytose de la toxine botulique A à travers des monocouches polarisées de cellules intestinales

Le modèle des cellules intestinales (CaCo-2) cultivées sur filtre développé par E. Pringault a été utilisé en collaboration avec son équipe. Dans ces conditions de culture, les cellules intestinales telles que CaCo-2, ICCL2, T84 forment une monocouche de cellules polarisées avec constitution des jonctions intercellulaires. BoNT/A purifiée ou sous forme de complexe, a été inoculée du côté apical des cellules. Le passage de la neurotoxine a été évalué en déterminant la dose létale (DL50) par titrage chez la souris. L'intégrité de la monocouche cellulaire, suivie par mesure de la résistance électrique transépithéliale et visualisation en immunofluorescence de l'actine, des jonctions apicales (ZO1) et basolatérales (E-cadhérine), n'a pas été modifiée au cours du traitement par les toxines. La neurotoxine botulique A seule est capable de traverser une monocouche de cellules carcinomateuses du colon CaCo-2 ou T-84 (taux de passage d'environ 0.2%) et de façon plus efficace les cellules intestinales de crypte comme ICCL2 (taux de passage d'environ 1%). Ce passage intervient à 37°C et est bloqué à 4°C. De plus, il est saturable dans un délai de 30-60 min. Ceci indique qu'il s'agirait d'un processus d'endocytose-transcytose médié par récepteur. Les inhibiteurs pharmacologiques comme nocodazole, colchicine (désorganisation du réseau de tubuline), monensin (blocage de l'acidification des endosomes), bafilomycine A1 (inhibiteur des v-ATPases) sont sans effet sur le passage de la neurotoxine.

Ces résultats indiquent qu'il existerait des récepteurs spécifiques de la neurotoxine sur des cellules intestinales.

Liaison de la neurotoxine botulique A aux cellules intestinales et cellules neuronales

Des études antérieures ont montré que le domaine de liaison des neurotoxines botuliques à leur récepteur à la surface des cellules cibles est localisé dans la moitié C-terminale de la chaîne lourde (fragment Hc).

Ainsi, les fragments Hc de la neurotoxine botulique A, B et de la toxine tétanique ont été produits en tant que protéines recombinantes avec un tag de quatre cystéines, purifiées et ensuite marquées avec un fluorophore (Alexa, Cy3 ou Cy5) de type maléimide. Des constructions en fusion avec la protéine verte (GFP) ont également été réalisées.

La liaison des fragments Hc fluorescents à divers types cellulaires a été étudiée par la méthode de "fluorescence activated cytometry" (FACS). Une liaison de forte intensité est

observée entre Hc de BoNT/A et les cellules neuronales comme NG108 ou des cellules chromaffines (PC12) et de façon nettement plus faible (3 à 6 fois moins) avec des cellules intestinales comme CaCo-2 et ICCL2. Cependant, la liaison est deux fois plus intense avec les cellules de crypte ICCL2 que les enterocytes CaCo-2. Un niveau très faible de fluorescence du même ordre que le bruit de fond est enregistré avec les cellules non-neuronales et non-intestinales (Vero, Cos, Hela). Lorsque le fragment Hc de BoNT/A est dénaturé par la chaleur (70°C, 15 min), aucune liaison spécifique n'est mesurée avec les cellules neuronales ou intestinales.

Ces résultats montrent que le domaine Hc de BoNT/A reconnaît des récepteurs spécifiques sur les cellules neuronales ainsi que sur les cellules intestinales, mais avec une plus faible intensité. Les récepteurs pour BoNT/A sur les cellules intestinales seraient de plus faible affinité ou seraient en moins grand nombre.

Il a été montré que le récepteur de la toxine tétanique est localisé dans des microdomaines lipidiques riches en cholestérol et sphingolipides de la membrane des cellules cibles. La méthyl- β -cyclodextrine (M β CD) qui séquestre les molécules de cholestérol a été utilisée dans les essais de FACS avec le fragment fluorescent Hc de BoNT/A. Une baisse modérée de liaison de Hc BoNT/A a été observée avec les cellules traitées avec la M β CD: 20% pour les NG108, 40% pour les ICCL2 et 50% pour les CaCo-2. En utilisant la perfringolysine dont le récepteur est le cholestérol membranaire, la baisse de liaison est beaucoup plus drastique (70-80%). Ainsi, le récepteur de BoNT/A sur les cellules neuronales ou intestinales ne serait pas directement localisé dans des microdomaines lipidiques, mais peut-être dans des domaines adjacents qui seraient partiellement désorganisés par la M β CD. L'effet plus important de la M β CD sur les cellules CaCo-2 pourrait refléter des localisations différentes du récepteur selon les types cellulaires.

La liaison de Hc fluorescent de BoNT/A aux cellules a aussi été analysée en microscopie confocale. Les cellules ont été cultivées sur des lamelles de verre, incubées avec Hc fluorescent à 4°C pendant 30 min puis fixées et observées en microscopie. Une coloration très intense de Hc de BoNT/A a été visualisée à la périphérie et au niveau des extensions des cellules neuronales NG108 et des cellules chromaffines PC12, alors que le signal était de plus faible intensité avec les cellules intestinales ICCL2 et encore plus bas avec les cellules CaCo-2. La fluorescence de type ponctué à la surface des cellules intestinales évoque une localisation du récepteur de BoNT/A sur la membrane en bordure en brosse.

Le fragment Hc de BoNT/A contrôle la transcytose de BoNT/A à travers les cellules intestinales

Le fragment recombinant Hc de BoNT/A a été incubé avec la toxine entière BoNT/A dans le compartiment apical de monocouches de cellules intestinales et le passage de BoNT/A à travers la barrière cellulaire a été suivi par dosage de l'activité létale de BoNT/A dans le compartiment baso-latéral. Une réduction de passage de la toxine d'environ 90% a ainsi été mesurée. Lorsque du fragment Hc de BoNT/B ou de la toxine tétanique a été utilisé dans les mêmes conditions, aucune réduction significative du passage de BoNT/A n'a été observée. Ces résultats confirment que BoNT/A est transporté à travers les cellules intestinales par un mécanisme de transcytose dépendant d'un récepteur spécifique de BoNT/A qui est distinct de celui de BoNT/B ou de la toxine tétanique. De plus, le fragment Hc de BoNT/A qui est impliqué dans la reconnaissance de récepteur spécifique sur les cellules neuronales, dirige aussi la reconnaissance de BoNT/A sur les cellules intestinales.

Les gangliosides GD_{1b} et GT_{1b} font partie du récepteur de BoNT/A sur les cellules intestinales

Le récepteur des neurotoxines botuliques sur les cellules neuronales a été défini comme étant constitué d'une partie gangliosidique (gangliosides de la série GD_{1b} et GT_{1b}) et d'une partie protéique. Afin de vérifier si le récepteur de BoNT/A sur les cellules intestinales contient aussi des gangliosides, BoNT/A a été préincubé avec une préparation de gangliosides enrichis en GD_{1b} et GT_{1b} avant d'être inoculé dans le compartiment apical de monocouches de cellules ICCL2 ou CaCo-2. Une diminution d'environ 40% du transport de BoNT/A à travers ces monocouches de cellules intestinales a ainsi été observé. Comme contrôle, la préincubation de BoNT/A avec le ganglioside GM1 ne s'est pas accompagné de réduction significative du passage de BoNT/A.

L'insertion de gangliosides GD_{1b} et GT_{1b} dans les membranes de cellules intestinales n'augmente pas de façon significative la liaison de Hc fluorescent aux cellules ni la transcytose de BoNT/A.

Ainsi, ces résultats indiquent que les gangliosides GD_{1b} et GT_{1b} font partie du récepteur fonctionnel de BoNT/A à la surface des cellules intestinales, mais que les gangliosides seuls rajoutés aux membranes ne sont pas suffisants pour diriger la liaison et le transcytose de BoNT/A.

Partie protéique du récepteur de BoNT/A sur les cellules intestinales

Récemment, il a été montré que la protéine des vésicules synaptiques SV2 est le récepteur physiologique de BoNT/A à la surface des cellules neuronales. Nous avons analysé si cette protéine est exprimée dans les cellules intestinales. A l'aide de la technique

d'immunoempreinte, nous avons mis en évidence que l'isoforme SV2-C était produit dans les cellules ICCL2 et dans une moindre mesure dans les cellules CaCo-2. Le domaine intravésiculaire de SV2-C a été produit en tant que protéine recombinante et a été utilisé dans des essais de compétition de transcytose de BoNT/A à travers des monocouches de cellules ICCL2 ou CaCo-2. Une diminution d'environ 50% du transport de BoNT/A à travers les deux types cellulaires a ainsi été observée. Ceci supporte que SV2-C, ou une protéine apparentée, serait impliqué dans le récepteur de BoNT/A à la surface des cellules intestinales.

Caractérisation de l'entrée de la neurotoxine botulique A dans l'épithélium intestinal de souris.

Le fragment Hc de la neurotoxine botulique A marqué avec Alexa488 a été utilisé pour visualiser, dans un premier temps, les sites potentiels de fixation de la neurotoxine botulique A sur l'épithélium intestinal de souris, et ensuite pour essayer de suivre la voie d'entrée de cette toxine (voir rapport précédent). Des essais ont ainsi été réalisés en collaboration avec l'équipe de J. Molgo, et il semblerait que les cellules des cryptes intestinales constituent une voie privilégiée d'entrée de la toxine botulique A.

Un résultat intéressant consiste dans l'observation que Hc fluorescent de BoNT/A se fixe spécifiquement sur certaines terminaisons nerveuses des plexus sous-muqueux et musculaire de la paroi intestinale. Les terminaisons cholinergiques semblent être une cible préférentielle pour BoNT/A. Des travaux sont en cours pour définir le routage de BoNT/A directement dans certaines terminaisons nerveuses de la paroi intestinale.

Vectorisation de substrat non clivable de la neurotoxine botulique A dans les neurones dans une approche thérapeutique.

Le seul traitement spécifique du botulisme repose sur les anticorps neutralisants des toxines botuliques. Mais ceux-ci ne sont efficaces qu'en tout début de la maladie, car ils n'ont pas la possibilité de pénétrer dans les neurones et donc d'inactiver les toxines *in situ*. Une nouvelle stratégie du traitement du botulisme est basée sur l'internalisation dans les neurones d'un substrat non clivable par les toxines botuliques qui soit capable de restaurer la fonction du substrat endogène protéolysé par les toxines. Dans les motoneurones, BoNT/A clive spécifiquement la protéine SNAP25 qui est indispensable dans le mécanisme de libération évoquée de l'acétyl-choline. L'objectif de ce programme est d'étudier l'effet d'un mutant de SNAP25 non clivable par BoNT/A sur la restauration de la libération de neuromédiateur bloquée par la toxine.

De nombreuses toxines bactériennes ont la particularité de reconnaître spécifiquement un récepteur à la surface des cellules et de rentrer par endocytose dans ces cellules où elles

exercer leur activité toxique. Les toxines peuvent être modifiées pour servir de vecteur apte à internaliser une protéine d'intérêt dans une cellule cible. Deux modèles de toxine ont été choisis pour véhiculer spécifiquement SNAP25 muté dans des cellules nerveuses : la toxine binaire iota de *C. perfringens* et la chaîne lourde des neurotoxines.

La toxine binaire iota de *C. perfringens* est constituée de deux protéines indépendantes, le composant Ib qui possède les domaines de reconnaissance du récepteur et de translocation à travers la membrane cellulaire, et le composant enzymatique, Ia, qui est relargué dans le cytosol et est responsable de l'activité intracellulaire de la toxine. Nous avons déjà utilisé cette toxine pour faire rentrer efficacement des protéines, comme l'enzyme C3, dans des cellules. Pour cela, la molécule de SNAP25 muté est fusionnée à un composant Ia, modifié de façon à être non toxique, pour être internalisé dans les cellules à l'aide du composant Ib. La spécificité pour les cellules neuronales de ce système de vectorisation est assurée en interchangeant le domaine de liaison au récepteur de Ib par un autre domaine spécifique de récepteurs neuronaux, comme celui (Hc) des toxines botuliques.

Un autre modèle de vectorisation est basé sur la neurotoxine botulique elle-même. En effet, la chaîne lourde (Hc) de la toxine botulique cible spécifiquement les neurones et permet l'entrée de la chaîne légère qui est la partie de toxine responsable de l'activité intracellulaire. Pour cela, la protéine SNAP25 muté est fusionnée à la chaîne lourde (aa 421-1296) de BoNT/A. Le tag six histidines, qui permet la purification de la protéine, est localisé en N-terminal de cette protéine. La construction a été effectuée de telle façon qu'il subsiste dans la protéine recombinante la portion de toxine contenant le site d'activation de la toxine par la protéase de *C. botulinum*. De la même façon, l'extrémité C-terminale (aa 421-138) de la chaîne légère de BoNTA a également été conservée dans la protéine chimère, permettant ainsi théoriquement la formation du pont disulfure entre cette extrémité de la chaîne légère et la chaîne lourde. Le mécanisme d'entrée de l'extrémité SNAP25 de cette chimère dans les cellules nerveuses devrait donc en théorie être le même que celui de la chaîne légère de BoNT/A dans le cas de la toxine native.

Les vecteurs ADN pour la production des protéines recombinantes, Ia-SNAP25 muté, Ib-Hc, et SNAP25 muté-Hc ont été construits, et les protéines correspondantes ont été produites chez *E. coli* et purifiées. Des difficultés ont été rencontrées pour la production de quantités suffisantes de ces protéines.

Dans un premier temps, la spécificité d'adressage de ces systèmes de vectorisation aux cellules nerveuses est étudiée à l'aide de ces protéines recombinantes marquées par un fluorophore et incubées avec différents types de cellules. L'analyse est effectuée par microscopie confocale à fluorescence.

Des premiers essais indiquent que la vectorisation de SNAP25 muté dans des cellules neuronales avant l'intoxication par BoNT/A prévient le blocage de la libération de neuromédiateur induit par la neurotoxine, mais aurait un effet limité lorsqu'elle intervient postérieurement à l'intoxication par BoNT/A. L'internalisation de ces systèmes de vectorisation dépendant du récepteur de BoNT/A sur les cellules neuronales serait inhibée au cours de l'intoxication par BoNT/A. Les travaux sont en cours pour comprendre cette situation et améliorer les systèmes de vectorisation.

Processus d'entrée dans la cellule des toxines binaires de *Clostridium*, toxine iota de *C. perfringens* et toxine C2 de *C. botulinum*.

Les toxines binaires se caractérisent par le fait qu'elles sont constituées de deux chaînes protéiques indépendantes non réunies par une liaison covalente ou un pont disulfure, l'une étant le composant binding (Ib ou C2-II pour les toxines iota et C2, respectivement) et l'autre le composant enzymatique (Ia ou C2-I pour les toxines iota et C2, respectivement). Le composant binding reconnaît un récepteur spécifique, encore non identifié, à la surface des cellules, s'oligomérisent et permet l'endocytose du composant enzymatique. Ce dernier catalyse la réaction d'ADP-ribosylation ayant pour substrat l'actine cellulaire sous forme globulaire. L'intoxication par les toxines Iota ou C2 se traduit par une dépolymérisation de l'ensemble des filaments d'actine et un arrondissement des cellules. Bien que ces deux toxines soient structurellement et fonctionnellement apparentées, elles se distinguent par la reconnaissance de récepteurs cellulaires distincts et par un mode d'entrée dans les cellules sensiblement différent. Ces toxines représentent des vecteurs appropriés pour internaliser dans les cellules des protéines d'intérêt thérapeutique ou de marqueurs en biologie cellulaire. La caractérisation précise des voies et des processus d'entrée de ces toxines dans les cellules permettrait de développer des systèmes de vectorisation adaptés.

Nous avons montré que les deux toxines sont inhibées par les inhibiteurs de l'ATP-ase vésiculaire (Bafilomycine A1 et Concanamycine) et requièrent donc un pH acide pour la translocation du composant enzymatique dans le cytosol. De plus, lorsque les cellules sont traitées par la Bafilomycine A1, une exposition brève à un pH acide permet l'entrée des toxines iota et C2 à travers la membrane plasmique. La toxine iota exigerait un pH plus acide que la toxine C2 pour transloquer le composant enzymatique dans le cytosol. Lorsque la Bafilomycine A1 est appliquée à différents temps après le traitement par les toxines Iota ou C2, elle induit une protection des cellules sur une période plus courte pour C2 (15 min) que pour Iota (35-40 min). Ceci indique que le processus d'endocytose est plus court pour C2 que pour Iota. Les deux toxines utiliseraient des voies d'endocytose différentes, la translocation du composant C2-I interviendrait au niveau des endosomes précoces et celui de Ia au niveau des

"endocytic carrier vesicles" (intermédiaires entre endosomes précoces et tardifs) qui ont des contenus en pH différents.

Ces toxines ne transitent pas par l'appareil de Golgi (absence d'inhibition par la Brefeldine et le nocodazole). De ce fait, la translocation du composant enzymatique intervient probablement à partir des endosomes précoces ou tardifs. Cependant, la toxine C2 contrairement à la toxine Iota, est bloquée par les agents alcalinisants (chloroquine, monensin). Mais, une association de monensin et de valinomycine (un ionophore spécifique du potassium) inhibe la toxine Iota. Ceci montre que l'entrée de la toxine C2 requiert un gradient de pH entre le compartiment endosomal et le cytosol, et que la toxine Iota exige en plus un gradient de potentiel de membrane.

Nous avons préalablement montré que le composant Ib s'oligomérisait et forme des canaux à travers les bicouches lipidiques et les membranes cellulaires, qui sont probablement utilisés par le composant enzymatique pour transloquer dans le cytosol. Pour mieux comprendre la formation de ces canaux et les propriétés de transfert du composant enzymatique, des mutants de Ib dans le domaine de formation du pore est en cours d'étude. Ceci permettrait également d'optimiser ces toxines comme système de transfert dans les cellules de protéines d'intérêt.

Toxine létale de *Clostridium sordellii* : modification des barrières épithéliales et activité *in vivo*. (B. Geny, M. Popoff, en partie travail de thèse de C. Boehm)

La toxine létale de *Clostridium sordellii* (LT) est une glycosyltransferase qui inactive les GTPases de la famille Rho et Ras. *C. sordellii* est responsable de gangrènes qui sont actuellement rares. Mais récemment, des chocs toxiques sévères avec mortalité dus à cette bactérie ont été rapportés chez des femmes prenant la pilule RU486.

La toxine LT modifie de façon drastique la perméabilité des barrières épithéliales (cellules MDCK ou MCCD cultivées sur filtre). La toxine LT désorganise les filaments d'actine baso-latéraux, sans modifier le réseau d'actine apical. De même, LT altère les jonctions adhérentes (remaniement profond du marquage de la E-cadhérine), alors que les jonctions apicales ne sont pas affectées (absence de modification du marquage ZO-1 et occludine, faible altération des jonctions serrées en cryofracture et microscopie électronique). LT induit un remaniement de l'ensemble du complexe E-cadhérine-caténines qui est délocalisé de la membrane plasmique et apparaît de façon diffuse dans le cytosol. Nous avons montré que la perturbation des jonctions adhérentes induites par LTs ne résulte pas d'un effet direct des toxines sur les protéines des jonctions adhérentes et ni d'une signalisation de Rac indépendante de l'actine, mais plutôt d'une désorganisation du cytosquelette d'actine basolatérale dépendant de Rac. Ces résultats supportent qu'un équilibre dynamique des

filaments d'actine corticale soit essentiel pour l'organisation fonctionnelle des jonctions à E-cadhérine dans les épithéliums (Boehm *et al.*, Cell. Microbiol. 2006, 8: 1070-1085). Des travaux sont en cours pour comprendre les voies de signalisation affectées par LT qui conduisent au remodelage des jonctions à E-cadhérine.

Le mode d'action de LT a été exploré chez la souris. LT entraîne la mort des souris, même après injection de faibles quantités. C'est une des toxines les plus actives après les neurotoxines botuliques. A la suite d'injection de quantité minimale (1 à 5 doses létales) de LT par voie intrapéritonéale, les signes cliniques se manifestent dans un délai de 10-12 h et se traduisent par une cyanose des muqueuses, une déshydratation, et une détresse cardio-respiratoire. L'autopsie révèle essentiellement un épanchement abondant dans la cavité thoracique. L'analyse des paramètres sanguins dénote une augmentation de l'hématocrite, une augmentation de l'érythropoïétine sérique, et une absence de réponse inflammatoire (pas d'élévation du taux des cytokines et lymphokines). L'examen anatomopathologique a mis en évidence un œdème des séreuses cardio-respiratoires. Une altération des endothéliums vasculaires pulmonaires était visible en microscopie électronique. L'immunomarquage de la VE-cadherine a révélé une altération des jonctions adhérentes des endothéliums vasculaires pulmonaires. Ainsi, LT induit un œdème massif au niveau de la sphère respiratoire qui se traduit par une insuffisance respiratoire aiguë, une déshydratation, et une défaillance cardiaque, sans réponse inflammatoire.

7 – PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- **Carlier J. P., Bedora-Faure M.** Phenotypic and genotypic characterization of some *Moorella* sp. strains isolated from canned foods. **Syst. Appl. Microbiol** 2006, 29: 581-588.

- **Carlier J.P., Bonne I., Bedora-Faure M.** Isolation from canned foods of a novel *Thermoanaerobacter* species phylogenetically related to *Thermoanaerobacter mathranii* (Larsen 1997): emendation of the species description and proposal of *Thermoanaerobacter mathranii* subsp. *alimentarius* subsp. nov. **Anaerobe**. 2006, 12:153-159.

- F. Roblot, **M.R. Popoff, J. P. Carlier**, C. Godet, P. Abbadie, S. Matthis, A. Eisendorn, G. Le Moal, B. Becq-Giraudon, and P. Roblot. Botulism in Patients Who Inhale Cocaine: The First Cases in France. **Clin. Infect. Dis.** 2006, 43 : e51 – e 52.

- **J. P. Carlier, M. Manich**, C. Loïez, H. Migaud and R. J. Courcol. First isolation of *Clostridium amygdalinum* from a patient with a chronic osteitis. **J. Clin. Microbiol.** 40 (10): 3842 – 3844, 2006.

- Srdjan Stepanovic, Dragana Vukovic, **Marie Bedora-Faure, Guylène K'ouas**, Slobodanka Djukica, Milena Svabic-Vlahovic, **Jean-Philippe Carlier**. Surgical wound infection associated with *Psychrobacter phenylpyruvicus*-like organism. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease** 57 (2007) 217–219.

- **Couesnon A., Raffestin S., Popoff M. R.** Expression of botulinum neurotoxins A and E, and associated non-toxin genes, during the transition phase and stability at high temperature: analysis by quantitative reverse transcription-PCR. **Microbiol.** 2006, 152: 759-770.

- Dupuy B., **Raffestin S., Matamouros S., Mani N., Popoff M. R., Sonenshein A. L.** Regulation of toxin and bacteriocin gene expression in *Clostridium* by interchangeable RNA polymerase sigma factors. **Mol. Microbiol.** 2006, 60: 1044-1057.

- **Boehm C., Gibert M., Geny B., Popoff M. R., Rodriguez P.** Modification of epithelial cell barrier permeability and intercellular junctions by *Clostridium sordellii* lethal toxins. **Cell. Microbiol.** 2006, 8: 1070-1085.

- Boyer L., Doye A., Rolando M., Flatau G., Munro P., Gounon P., Clément R., Pulcini C., **Popoff M. R.**, Mettouchi A., Landraud L., Dussurget O., Lemichez E. Induction of transient macroapertures in endothelial cells through RhoA inhibition by *Staphylococcus aureus* factors. **J. Cell Biol.** 2006, 173, 809-819.
- **Geny B., Popoff M. R.** Bacterial protein toxins and lipids: role in toxin targeting and activity. **Biol. Cell** 2006, 98: 633-651.
- **Geny B., Popoff M. R.** Bacterial protein toxins and lipids: pore formation or toxin entry into cells. **Biol. Cell** 2006, 98: 667-678.

Edition de livre

- The Source Book of Bacterial Protein Toxins, Alouf J. E. and **Popoff M. R.** (Eds) Elsevier-Academic Press, Amsterdam, 2006, 1047 p.

Chapitres de livres

- **Jean-Philippe Carlier.** Gas chromatography of metabolic end products and cellular fatty acids for identifying of anaerobic bacteria. Technical book. European Concerted Action genus *Clostridium*. 2006: 130-141.
- Poulain B., Kaihrallah G., Jover E., Molgo J., **Popoff M. R.** Aspects moléculaires et cellulaires du blocage de neurotransmission par les toxines botuliques. In Les Amis du *Clostridium*, Tome V, Toxine botulique: douleur et applications en ORL (Nieoullon A., Poulain B., Rascol O., Christen Y. eds). Solal, Marseille, 2006, 19-41.
- **Popoff M. R.**, Stiles B. G. Bacterial toxins and virulence factors targeting the actin cytoskeleton and intercellular junctions. In The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, 3^o ed, Alouf J E. and Popoff M. R. (Eds), Academic Press-Elsevier, Amsterdam, 2006, 154-187.
- Poulain B., Stiles B. G., **Popoff M. R.**, Molgo J. Attack of the nervous system by clostridial toxins: physical findings, cellular and molecular actions. In The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, 3^o ed, Alouf J E. and Popoff M. R. (Eds), Academic Press-Elsevier, Amsterdam, 2006, 348-389.
- Basak, A. K., **Popoff M. R.**, Titball R. W., Cole A. *Clostridium perfringens* ϵ -toxin. In The Sourcebook of Bacterial Protein Toxins, 3^o ed, Alouf J E. and Popoff M. R. (Eds), Academic Press-Elsevier, Amsterdam, 2006, 631-642.
- **Popoff M. R.**, Titball R. W. Toxinotyping by phenotypic and genetic assays. In Clostridia in medical, veterinary and food microbiology. Diagnosis and typing. J. Mainil (Ed.), European Commission, Brussels, 2006, 142-186.

- Poulain B., Kaihrallah G., Jover E. , Molgo J., **Popoff M. R.** Aspects moléculaires et cellulaires du blocage de la neurotransmission par les toxines botuliques. In Les Amis du *Clostridium* Tome V, Toxine botulique: douleur et applications en ORL, Nieoullon A., Poulain B., Rascol O., Christen Y. (Eds), Solal, Marseille, 2006: 19-41.
- **Popoff M. R.**, Stiles B. Bacterial toxins modifying the actin cytoskeleton. In Recent Reserach Developments in Toxins from Bacteria and other Organisms, Gillet D. and Johannes L. (Eds), Research Singpost, Trivandrum Kerala 2006: 265-299.
- **Couesnon A.**, **Pereira Y.**, Stiles B., **Popoff M. R.** Toxin gene regulation. In Recent Reserach Developments in Toxins from Bacteria and other Organisms, Gillet D. and Johannes L. (Eds), Research Singpost, Trivandrum Kerala 2006: 35-68.
- **Popoff M. R.** Clostridial binary toxins, an ingenious bacterial strategy to overcome cell barrier integrity. In Crossroads between Bacterial Protein Toxins and Host Cell Defences. Fiorentini C., Tavaglione S., Fabbri A. (Eds). Transworld Research Network, Trivandrum Kerala 2006: 1-33.

Publications dans des revues de langue française

- **Carlier J. P.**, **Manich M.**, **K'Ouas G.**, **Bedora-Faure M.**, **Popoff M. R.** Point sur une maladie oubliée: le syndrome de Lemierre. **Bull. Epid. Hebdo.** 2006, 18: 127-128.

Principaux congrès auxquels le laboratoire a participé

- Congrès sur les Clostridium Clospath2006
- Congrès SFM anaérobies Lille, 22- 23 juin 2006.
- 3° Colloque International francophone de Bactériologie Vétérinaire, Liège (Belgique) 11-13 juillet 2006
- 14° Rencontres en Toxinologie "Toxines et Cancer", Paris 30 nov -1 décembre 2006, organisées par la SFET.

8 – ANNEXES

TABLEAU 1

NOMBRE DE DEMANDES D'IDENTIFICATIONS DE SOUCHES
PAR DEPARTEMENT

DEPARTEMENT	NOMBRE
02	6
03	3
06	16
16	9
17	4
21	1
23	1
25	2
29	1
31	1
33	3
34	111
38	2
41	1
42	1
45	3
47	1
49	4
51	1
54	14
57	5
58	4
59	19
60	8
62	15
64	6
67	2
69	4
71	5
72	6
74	5
75	13
76	1
77	1
78	4
79	1
81	5
83	9
85	1
89	6
92	7
93	6
94	4
95	6
97	9
98	1
Expéditeur inconnu	1
Etranger	6

TABLEAU 2**REPARTITION DES SOUCHES HUMAINES PAR SITES D'INFECTIONS**

Pour la période Du 01/01/2006 au 31/12/2006

SYSTEME NERVEUX CENTRAL	4
INFECTIONS ORL (Amygdale, sinus)	3
OPHTALMOLOGIE	3
INFECTIONS CUTANEEES (abcès, suppurations)	9
INFECTIONS INTRA-ABDOMINALES (Pus, redon)	1
INFECTIONS HEPATIQUES / PANCREATIQUES	2
INFECTIONS PLEURO-PULMONAIRES	1
INFECTIONS OSSEUSES	7
INFECTIONS POST-OPERATOIRES	6
HEMOCULTURE	52
COPROCULTURE	73
APPAREIL DIGESTIF	3
GYNECOLOGIE	2
NON PRECISE	179

TOTAL 345

TABLEAU 3**SOUCHES D'ORIGINE HUMAINE: Répartition par genres**

Période du 01/01/2006 au 31/12/2006

GERME	NOMBRE
ACTINOMYCES	3
BACILLUS	2
BACTEROIDES	13
CAMPYLOBACTER	1
CLOSTRIDIUM	213
DESULFOMONAS	1
DIALISTER	1
EGGERTHELLA	8
EUBACTERIUM	4
FUSOBACTERIUM	19
JOHNSONELLA	1
LEPTOTRICHIA	1
PEPTONIPHILUS	1
PEPTOSTREPTOCOCCUS	1
PORPHYROMONAS	1
PREVOTELLA	11
PROPIONIBACTERIUM	5
SELENOMONAS	1
SYNERGISTES	4
VEILLONELLA	3
DIVERS	51

TOTAL: 345

TABLEAU 4

SOUCHES D'ORIGINE HUMAINE: Répartition par espèces

Période du 01/01/2006 au 31/12/2006

GERME	NOMBRE
ACTINOMYCES MEYERI	2
ACTINOMYCES SP.	1
ALISTIPES PUTREDINIS	1
BACILLUS SP.	2
BACTEROIDES DISTASONIS	1
BACTEROIDES FRAGILIS	7
BACTEROIDES OVATUS	1
BACTEROIDES THETA IOTAOMICRON	2
BACTEROIDES UNIFORMIS	1
CAMPYLOBACTER RECTUS	1
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	2
CLOSTRIDIUM BUTYRICUM	1
CLOSTRIDIUM CLOSTRIDIOFORME	3
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	167
CLOSTRIDIUM HASTIFORME	4
CLOSTRIDIUM HISTOLYTICUM	1
CLOSTRIDIUM INNOCUUM	1
CLOSTRIDIUM LIMOSUM	1
CLOSTRIDIUM MANGENOTI	1
CLOSTRIDIUM ORBISCINDENS	4
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	11
CLOSTRIDIUM RAMOSUM	5
CLOSTRIDIUM SORDELLII	1
CLOSTRIDIUM SP.	1
CLOSTRIDIUM SPOROGENES	4
CLOSTRIDIUM SUBTERMINALE	1
CLOSTRIDIUM SYMBIOSUM	2
CLOSTRIDIUM TERTIUM	1
DESULFOVIBRIO PIGER	1
DIALISTER SP.	1
EGGERTHELLA LENTA	8
EUBACTERIUM LIMOSUM	1
EUBACTERIUM SP.	3
FUSOBACTERIUM NECROPHORUM	8
FUSOBACTERIUM NECROPHORUM subspecies NECROPHORUM	1
FUSOBACTERIUM NUCLEATUM	9
FUSOBACTERIUM RUSSII	1
JOHNSONELLA IGNAVIA	1
LEPTOTRICHIA BUCCALIS	1
	1
FINEGOLDIA MAGNA	1
PORPHYROMONAS GINGIVALIS	1

TABLEAU 5

SOUCHES D'ORIGINE VETERINAIRE: Répartition par espèces

Période du 01/01/2006 au 31/12/2006

GERME	NOMBRE
CLOSTRIDIUM DIFFICILE	2
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	54
CLOSTRIDIUM SORDELLII	1
RECHERCHE DE BACTERIES ANAEROBIES NEGATIVE AEROBIE	15
	1
	73

TABLEAU 6

SOUCHES D'ORIGINE INDUSTRIELLE: Répartition par espèces

Période du 01/01/2006 au 31/12/2006

GERME	NOMBRE
CLOSTRIDIUM BARATII	1
CLOSTRIDIUM BIFERMENTANS	3
CLOSTRIDIUM BOTULINUM	8
CLOSTRIDIUM BUTYRICUM	1
CLOSTRIDIUM CHAUVOEI	1
CLOSTRIDIUM IRREGULARIS	1
CLOSTRIDIUM ORBISCINDENS	1
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS	1
CLOSTRIDIUM SEPTICUM	2
CLOSTRIDIUM SP.	1
CLOSTRIDIUM SPROGENES	5
CLOSTRIDIUM SUBTERMINALE	12
CLOSTRIDIUM TETANI	1
DETHIOSULFOVIBRIO PEPTIDOVORANS	1
PROPIONIBACTERIUM ACNES	1
THERMOANAEROBACTER THERMOCOPRIAE	1
BACTERIE AEROBIE	6
BACTERIE ANAEROBIE FACULTATIVE	1
BACTERIE NON IDENTIFIABLE	1
RECHERCHE DE BACTERIES ANAEROBIES NEGATIVE	1
	TOTAL: 50

TABLEAU 7

BOTULISME HUMAIN: NOMBRE DE CAS ET DE FOYERS

Diagnostic réalisé par recherche de toxine botulique dans des échantillons de sérums et/ou de selles

Nombre total de sérums analysés : 179

Nombre total de selles analysées : 17.

Liquide gastrique : 4

Urines : 1

NUMERO	DEPT	FAMILLE	Type A	Type B	SUSP Type B	Type E	Type indéterminé	TOTAL analyses	ALIMENT SUSPECT
15658	38	ARNA LOU	1	0	0	0	0	1	miel
15651	38	ARNA LOU	0	0	0	0	1	1	miel
15652	38	ARNA LOU	0	0	0	0	1	1	Miel
15375	40	BATS JOS	0	0	0	0	2	2	bocal asperge
15371	40	BATS MON	0	0	0	0	1	1	bocal asperge
15377	40	BATS MON	0	0	0	0	1	1	bocal asperge
15293	69	LAMB MAR	0	1	0	0	0	1	Préparation familiale
15273	69	LAMB MAR	0	1	0	0	0	1	
15297	33	RAIM JUL	0	0	1	0	0	1	
15298	91	BORM SER	0	0	1	0	0	1	
15324	94	AVAE SUZ	0	0	0	0	1	1	
15336	74	COLL PAT	0	0	0	0	2	2	terrines
15339	74	COLL PAT	1	0	0	0	0	1	terrines
15355	Zurich	AISS VER	0	0	0	0	1	1	
TOTALS POUR ANNEE 2006			2	2	2	0	9	16	

Nombre de foyers : 7 (+ 1 à Zurich)

Nombre de cas : 8 (+1 à Zurich)

TABLEAU 8

RECHERCHE D'ANTICORPS ANTIBOTULIQUES

Période Du 01/01/2006 au 31/12/2006

Recherche negative	10
Recherche positive. Titre supérieur ou égal α 4.10 ⁻² U.I./mL	1
Volume de sérum insuffisant pour faire un titrage:	1
TOTAL 12	

TABLEAU 9

BOTULISME ANIMAL : Répartition par espèces

Période du 01-1-2006 au 31-12-2006

<i>Espèce</i>	<i>Nombre total d'échantillons¹</i>	Cas positifs		Cas négatifs	Total des cas
Oiseaux sauvages	72 } 228 156	32	type C : 16 type C ou D : 15 type indéterminé : 1	23	55
Oiseaux d'élevage		56	type C : 2 type C ou D : 37 type D : 2 type indéterminé : 9 activité toxique non déterminée : 6	44	100
Bovins	35	7	type C : 4 type D : 2 type C ou D : 1	14	21
Cheval	4	0		3	3
Chien	6	2	type C ou D : 1 type indéterminé : 1	2	4
Animaux sauvages	2	0		1	1
Poissons	6	2	type C : 2	2	4
Espèce non précisée	2	1	type D : 1	1	2
TOTAL	283	100		90	190

¹Plusieurs prélèvements concernent parfois un même cas ou un même foyer.

TABLEAU 10**RECHERCHE DE BOTULISME CHEZ LES BOVINS**

Période du 01-01-2006 au 31-12-2006

Échantillon	Toxine botulique ¹	Culture d'enrichissement NT		Total
		Toxine botulique ¹	PCR	
Sérum Total : 11	type D : 1			1
Contenu intestinal Total : 21		type C : 1 type C ou D : 2	type C : 3 type D : 1 type C ou D : 1	7
Organes Total: 3			type C : 2 type D : 1	3

N, négatif ; C, type C ; D, type D

1 : Recherche de toxine botulique effectuée avec le test sur souris

Bovins pour lesquels des échantillons de sérum et de contenu intestinal ou d'organe ont été analysés simultanément.

Échantillon	Toxine botulique	Culture d'enrichissement		Total
		Toxine botulique	PCR	
Sérum	C ou D : 1			1
Contenu intestinal		type C ou D : 1	type C : 3 type C ou D : 1	5
Organes		N	type C : 2 type D : 1	3
Total BOVINS :				10

TABLEAU 11**BOTULISME DES OISEAUX D'ÉLEVAGE**

Période du 01-01-2006 au 31-12-2006

Espèce	Nombre total d'échantillons	Nombre de foyers	Foyers positifs	Type	Cas négatifs
Poulet	37	25	14	C D : 8 C : 5 Indéterminé : 1	11
Dindon	46	33	17	C : 1 D : 1 C ou D : 12 Indéterminé : 3	16
Caille	2	1	1	C : 1	0
Canard	28	21	10	C : 1 C ou D : 8 Indéterminé : 1	11
Faisan	28	16	11	C ou D : 9 C : 1 D : 1	5
Oie	2	1	0	-	1
Perdreux	5	3	1	C : 1	2
Pintade	6	4	0		4
Non précise	2	1	0	-	1
TOTAL :	156	105	54		51

TABLEAU 12**BOTULISME DES OISEAUX SAUVAGES**

Période du 01-01-2006 au 31-12-2006

Espèce	Nombre total d'échantillons	Nombre de foyers	Foyers positifs	Type	Cas négatifs
Canard	45	35	21	C : 11 D : C ou D : 10	14
Cygne	11	8	5	C : 2 C ou D : 3	3
Faisan	3	3	3	C ou D : 2 Indéterminé : 1	0
Foulque	6	4	1	C : 1	3
Mouette	4	4	2	C : 1 C ou D : 1	2
Autres oiseaux d'eau	3	3	0		3
TOTAL	72	57	32		25

TABLEAU 13**RECHERCHE DE BOTULISME AVIAIRE**

Période du 01-01-2006 au 31-12-2006

<i>Échantillon</i>	Recherche de toxine botulique	Total
Sérum Total 120	C	3
	C D	44
	D	1
	Indéterminé	6
	activité toxique non identifiée	14
	négatif	47
	Examen annulé / volume insuffisant	5

Echantillon	Culture d'enrichissement		Total
	Recherche de toxine botulique	Recherche de <i>C. botulinum</i> (PCR)	
Organe Total 2	C négatif		1 1
Contenu intestinal Total 106	C C CD CD négatif négatif négatif examen annulé	C négatif C négatif C D négatif	1 9 2 17 11 1 64 1

C, type C ; D, type D

FIGURE 1**BOTULISME AVIAIRE 2006**